Biotherapies for Life **ZLB Behring**



Immunoglobulines

Immunoglobuline anti-D de la dernière génération

Rhophylac® – prophylaxie rhésus en seringue préremplie administrable immédiatement par voie i.m. ou i.v.





Immunoglobuline anti-D de la dernière génération

Les produits anti-D sont utilisés avec succès depuis plus de 30 ans. Ils servent à empêcher la sensibilisation rhésus à l'antigène D chez les femmes Rhésus négatif et à prévenir ainsi la maladie hémolytique du nouveau-né.

Le système de groupe sanguin Rhésus se caractérise par la présence d'un grand nombre d'antigènes à la surface des globules rouges (hématies, érythrocytes). L'antigène Rh D, présent chez environ 85% des Caucasiens, est particulièrement important sur le plan clinique. Les individus portant un antigène Rh D sur la membrane de leurs hématies sont qualifiés de Rhésus positif; ceux qui n'en portent pas, de Rhésus négatif. Les anticorps spécifiquement anti-D se manifestent surtout pendant la grossesse en cas d'incompatibilité rhésus entre la mère et le fœtus ou après transfusion de sang rhésus incompatible. Sans traitement, jusqu'à 17 % des primigestes avec incompatibilité rhésus «mère Rh négatif, enfant Rh positif» seraient sensibilisées à l'antigène rhésus au cours de leur grossesse ou pendant l'accouchement. Le risque de sensibilisation rhésus augmente avec la quantité d'hématies fœtales Rh positif passant dans la circulation maternelle. La matière première de Rhophylac® provient du plasma de donneurs ayant accepté d'être sensibilisés à l'antigène D avec des hématies Rhésus (D) positif. Le nouveau procédé de fabrication développé par ZLB Bioplasma AG pour Rhophylac® permet d'obtenir un rendement plus élevé et de réaliser des économies de plasma plus importantes que les procédés traditionnels utilisés pour la fabrication de produits analogues.

Rhophylac® est utilisé

- pour la prophylaxie anténatale et postnatale de la sensibilisation rhésus en cas de possible incompatibilité rhésus,
- pour la prophylaxie de la sensibilisation rhésus en cas de possible incompatibilité rhésus, juste avant et après une intervention obstétricale,
- en cas d'erreur transfusionnelle (administration de sang Rh+ à un patient Rh–).

Rhophylac® est de haute pureté

- Enrichissement très spécifique en immunoglobulines anti-D. Ces anticorps appartiennent principalement aux sous-classes IgG1 et IgG3, qui sont présentes dans Rhophylac® en proportions beaucoup plus importantes que dans le plasma humain non traité.
- Proportion de monomères : > 99%
- Molécules natives, sans traitement enzymatique, thermique ou chimique
- Propriétés de liaison intactes des anticorps

Rhophylac® – prophylaxie rhésus en seringue prête à l'emploi



Rhophylac® est très bien toléré

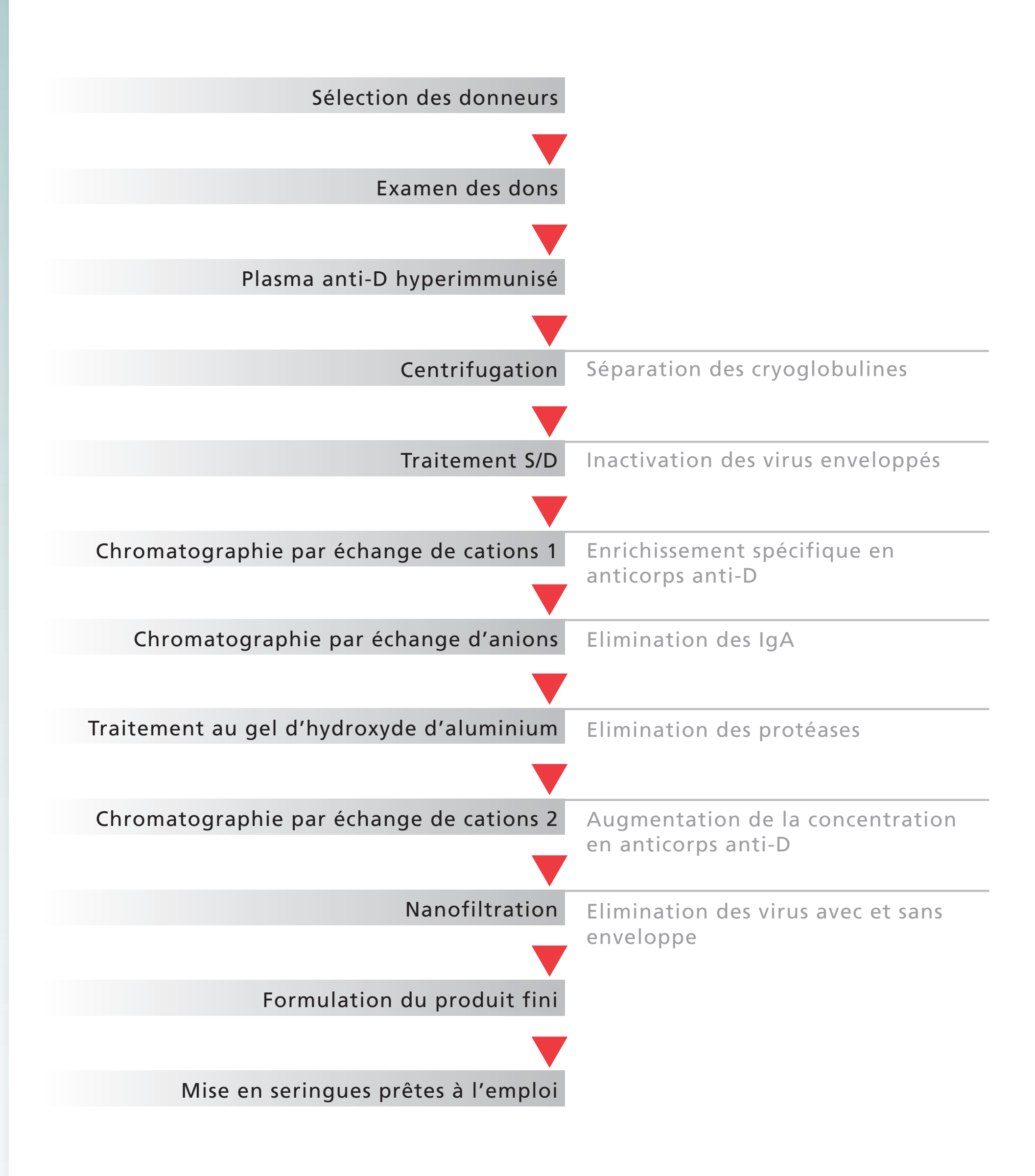
- Faible activité anticomplémentaire
- Teneur en IgA au-dessous du seuil de détection
- Sans agents conservateurs

Rhophylac® est simple d'emploi

- Seringue préremplie (prête à l'emploi)
- Injectable par voie i.v. ou i.m.
- Se conserve 3 ans à une température de 2 à 8 °C

Fabrication de Rhophylac®

Rhophylac® est fabriqué en plusieurs étapes par chromatographie d'adsorption à partir de pools de plasma humain provenant de donneurs et donneuses hyperimmunisés. Rhophylac® est un produit stable, d'un haut degré de pureté avec une teneur en IgA au-dessous du seuil de détection. La teneur de la fraction IgG anti-D purifiée est ajustée à 300 µg (Rhophylac® 300). Le produit est ensuite stabilisé par l'addition d'albumine humaine et de glycine puis, après filtration stérilisante, conditionné dans des seringues en verre. [A] Le procédé de fabrication chromatographique (voir ci-dessous) permet un meilleur rendement que les méthodes de fractionnement classiques et donc une utilisation plus parcimonieuse de la précieuse matière première.



Etant donné que Rhophylac® est produit à partir de plasma humain, il est absolument nécessaire de réduire à un minimum le risque de transmission d'infections virales. Les mesures suivantes sont appliquées à cet effet.

1. Sélection des donneurs

Un processus de sélection sévère permet d'éviter que du sang contaminé ne soit prélevé. Seul le sang de donneurs sains, minutieusement contrôlés et conscients de leur responsabilité est retenu pour la fabrication du produit.

2. Dépistage des marqueurs viraux / examen du don de sang

Chaque don de sang est soumis au dépistage de l'antigène HBs, des anticorps anti-HIV 1+2 et anti-HCV ainsi qu'au dosage de l'ALAT.

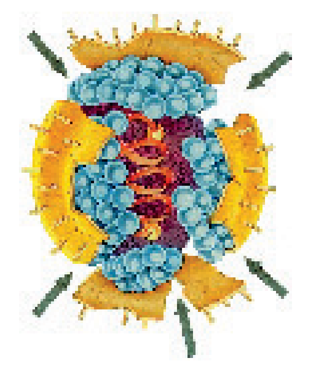
3. Dépistage par PCR

Le plasma est examiné par PCR afin de vérifier l'absence de virus enveloppés (HIV, HBV, HCV) et de virus sans enveloppe (HAV, parvovirus B19).

4. Inactivation des virus par traitement solvant/détergent (procédé S/D)

Les virus sont inactivés dans le pool de plasma dépourvu de cryoglobulines. Les virus à enveloppe lipidique (p.ex. HIV, HBV et HCV) qui pourraient encore s'y trouver sont détruits avec un mélange de Triton® X-100 et de tri-n-butylphosphate. [B,C,D] Cette opération n'a pas d'incidence sur l'activité fonctionnelle de Rhophylac®.

Fig. 1: Inactivation virale par traitement S/D

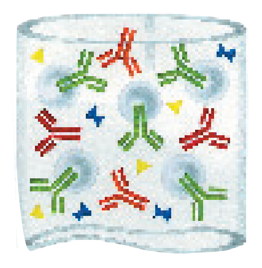


Avec un mélange solvant/détergent, l'enveloppe lipidique est détruite et par conséquence le virus inactivé.

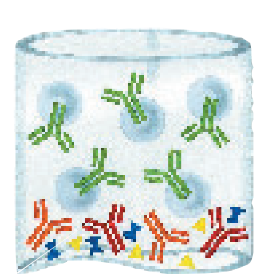
5. Elimination additionnelle des virus par divers procédés

Le plasma contenant les virus inactivés est appliqué sur une colonne échangeuse d'ions. Les conditions chromatographiques sont choisies de manière à favoriser la fixation de l'immunoglobuline G (IgG) anti-D et à faciliter l'élimination par lavage des composants plasmatiques indésirables ainsi que des solvants et détergents utilisés pour l'inactivation virale. Cette opération permet d'éliminer plus de 98 % des protéines plasmatiques. L'IgG anti-D spécifiquement enrichie est alors éluée en douceur de la colonne. Les IgA et les protéases sont éliminées au cours d'autres étapes de chromatographie et d'adsorption. Ces étapes contribuent également à une réduction supplémentaire des virus potentiellement présents.

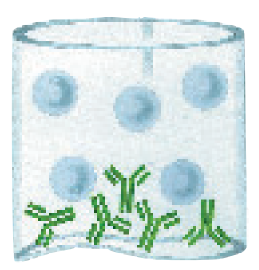
Fig. 2: Chromatographie d'échange d'ions



Liaison des immunoglobulines Anti-D au gel d'échange de cations



Elimination des composants plasmatiques indésirables

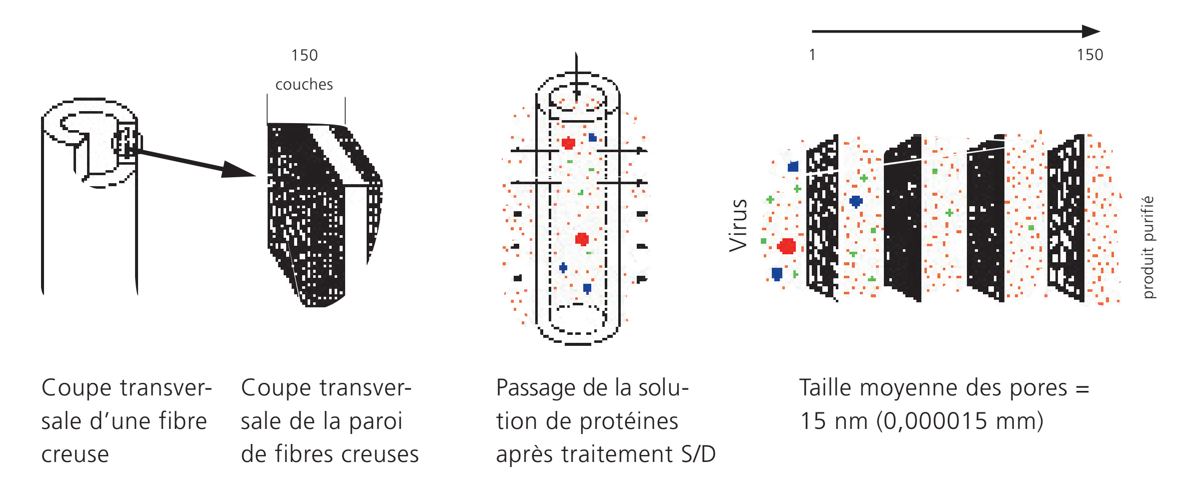


Séparation délicate des immunoglobulines anti-D du gel d'échange d'ions

6. Elimination des virus par nanofiltration

Une autre étape importante de l'élimination virale est la nanofiltration. La matière première préalablement purifiée est pompée au travers d'un système constitué de fibres creuses et de pores d'environ 15 nm de façon à ce que les virus éventuellement présents soient retenus par le filtre.

Fig. 3: Nanofiltration



Coupe transversale d'une fibre creuse

Coupe transversale de la paroi de fibres creuses

Passage de la solution de protéines après traitement S/D

Taille moyenne des pores = 15 nm (0,000015 mm)

7. Système d'assurance de la qualité

Les mesures cGMP (current Good Manufacturing Practice = bonnes pratiques de fabrication) assurent l'uniformité des méthodes de travail lors du prélèvement, du contrôle et du traitement des dons de sang. Le traitement informatique des données permet en outre de maximiser la sécurité en écartant le risque d'échanges involontaires et d'erreurs d'étiquetage.

Validation du procédé de fabrication quant à l'élimination et l'inactivation du virus

Pour valider un processus aussi complexe que la production de Rhophylac®, il convient d'abord de diviser le procédé de fabrication en plusieurs étapes. Chaque étape est reproduite en laboratoire mais il faut s'assurer au préalable que les opérations effectuées à cette échelle correspondent dans la mesure du possible aux conditions de la production industrielle. Avant chaque étape, on s'assurera que la matière en processus, obtenue directement en cours de production, contient une quantité connue de virus puis on déterminera la capacité d'élimination ou d'inactivation virale en mesurant la quantité résiduelle de virus après chaque étape de traitement. La différence entre la concentration initiale et la concentration finale permet de calculer le facteur de réduction logarithmique (FRL). FRL 4 signifie que le titre viral est réduit de 10'000 fois. Les valeurs FRL déterminées à chaque étape peuvent alors être additionnées afin d'obtenir le FRL de tout le processus. Pour la validation, des modèles viraux sont utilisés conformément aux exigences des autorités compétentes (cf. tableau 1).

Les résultats du tableau 2 montrent que les virus éventuellement présents en cours de production sont éliminés par deux mécanismes différents: par inactivation (pendant le traitement S/D) et par nanofiltration. Les procédés chromatographiques apportent une contribution supplémentaire à la réduction globale de l'élimination virale. [E]

Tableau 1. Modèles viraux

Virus	Sigle	Famille	Sous-famille de virus ou genre	Type de génome	Taille	Enveloppé
Virus de l'immuno-déficience humaine	VIH	Retroviridae	Lentivirinae	ARNsb(-)	80 – 100 nm	oui
Virus de la diarrhée virale bovine	BVDV	Flaviviridae	Pestivirus	ARNsb(+)	40 – 70 nm	oui
Virus de la pseudorage	PRV	Herpesviridae	Alpha-herpesviridae	ADNdb	120 – 200 nm	oui
Parvovirus canin	CPV	Parvoviridae	Parvovirus	ADNsb	18 – 24 nm	non
Parvovirus murin	MVM	Parvoviridae	Parvovirus	ADNsb	18 – 24 nm	non
Parvovirus bovin	BPV	Parvoviridae	Parvovirus	ADNsb	18 – 24 nm	non

Tableau 2. Elimination et inactivation virale

Virus	VIH	BVDV	PRV	Parvovirus (CPV/MVM)	Parvovirus (BPV)
Génome Enveloppe Taille	ARN oui 80 – 100 nm	ARN oui 40 – 70 nm	ADN oui 120 – 200 nm	ADN non 18 – 24 nm	ADN non 18 – 24 nm
Traitement S/D [1)]	≥ 6,0	≥ 5,4	≥ 5,6	nt	nt
Etapes chromatographiques [1)]	4,5	1,6	≥ 3,9	2,5	nt
Nanofiltration [1)]	≥ 6,3	≥ 5,5	≥ 5,6	3,4	≥ 5,6 [2)]
Facteur de réduction globale[1)]	≥ 16,8	≥ 12,5	≥ 15,1	5,9	≥ 5,6

nt non testé

1) unités $\log_{10}$

2) Ce chiffre montre que le parvovirus est complètement éliminé par nanofiltration en présence d'anticorps réactifs (contrairement au CPV ou au MVM, le BPV réagit de manière croisée avec les anticorps anti-B19 présents dans l'organisme).

VIH: virus de l'immunodéficience humaine, comme modèle de VIH 1 et VIH 2
BVDV: virus de la diarrhée virale bovine, comme modèle du virus de l'hépatite C
PRV: virus de la pseudorage, comme modèle des virus enveloppés à ADN (p.ex. virus Herpès)
CPV: parvovirus canin, comme modèle des virus non-enveloppés à ADN
MVM: parvovirus murin, comme modèle des petits virus non-enveloppés à ADN
BPV: parvovirus bovin, comme modèle du parvovirus humain B19

Rhophylac® contient au moins 10 UI/ml d'anticorps (IgG) dirigés contre le parvovirus humain B19.

Etudes cliniques avec Rhophylac®

Rhophylac® a été testé quant à sa sécurité, sa tolérance et son efficacité lors de cinq études cliniques au cours desquelles il a été administré par voie intraveineuse ou intramusculaire à 628 personnes Rhésus (D) négatif (36 sujets masculins et 592 femmes, dont 447 enceintes). [F,G,H,I,K]

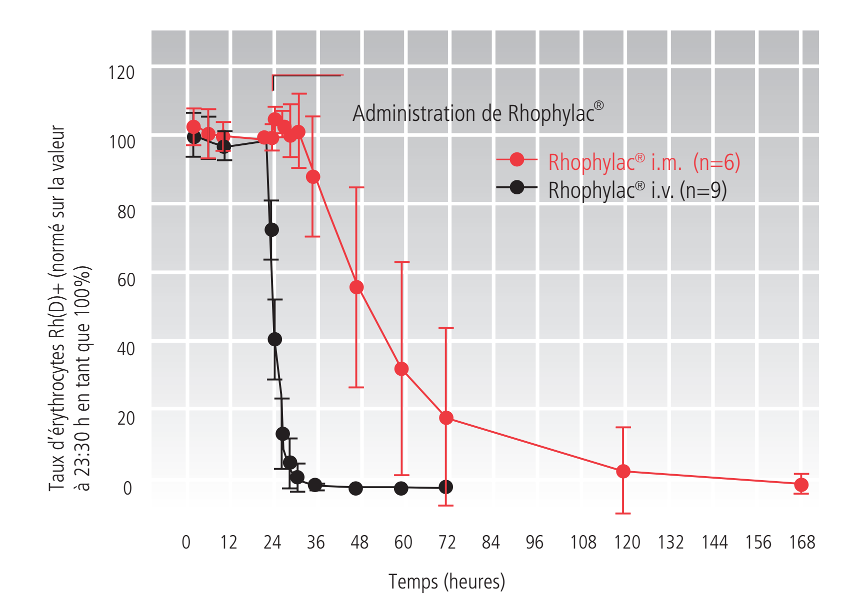
Sécurité et tolérance

Au total, Rhophylac® a été administré 931 fois au cours de ces études. Il s'est révélé fiable et bien toléré. A noter qu'aucun indice permettant de conclure à une transmission de virus (HAV, HBV, HCV, HIV, parvovirus B19) par Rhophylac® n'a pu être décelé lors des analyses spécifiques des échantillons de sang prélevés avant l'administration de Rhophylac® et six mois plus tard (1 semaine plus tard pour le parvovirus).
Les paramètres biochimiques de routine (chimie clinique, coagulation, hématologie, analyse d'urine) mesurés chez les femmes enceintes avant l'administration de Rhophylac® et une semaine plus tard n'ont pas révélé de modifications cliniquement importantes.
La plupart des effets médicamenteux indésirables étaient imputables aux complications typiques et prévisibles de la grossesse et non pas à l'administration de Rhophylac®. L'existence d'un lien de causalité entre Rhophylac® et les effets secondaires observés dans quelques cas isolés (p.ex. douleur ou prurit au site d'injection, céphalées, nausées) a été jugée possible ou même certaine. Ces effets secondaires rares ont été de faible intensité et sont aussi décrits pour d'autres préparations à base d'immunoglobulines anti-D. On n'a jamais observé de réactions anaphylactiques ou autres réactions allergiques graves sous Rhophylac®.

Etude auprès d'hommes Rhésus négatif en bonne santé

Il a été démontré que Rhophylac® élimine efficacement les érythrocytes Rh(D)+ de la circulation sanguine de sujets Rh(D) négatif.

*Fig. 4: Elimination moyenne d'érythrocytes Rhésus(D) positif après administration d'une dose de Rhophylac®**



Rhophylac® 300 a été injecté par voie intraveineuse à des sujets Rh(D) négatif 24 heures après l'administration de 15 ml d'érythrocytes Rh(D)+. Après 12 heures, 99 % des érythrocytes étrangers, en moyenne, avaient déjà été éliminés. Le fait que l'immunoglobuline injectée par voie intraveineuse soit immédiatement disponible permet d'éviter la perte de temps et d'efficacité due à l'absorption.

L'administration intramusculaire de Rhophylac® 300 a aussi entraîné une élimination efficace des érythrocytes Rh(D)+. Mais comme l'immunoglobuline anti-D doit être d'abord absorbée par le muscle, l'effet est retardé. C'est pourquoi il a fallu attendre six jours avant de pouvoir constater que la concentration d'érythrocytes Rh(D)+ a diminué de 99 % en moyenne.

* M. Stucki, J. Schnorf, H. Hustinx et al. Anti-D immunglobulin in Rh(D) negative volunteers : clearance of Rh(D) positive cells and kinetics of serum anti-D levels. Transfus. Clin. Biol. 1998; 5:280-300

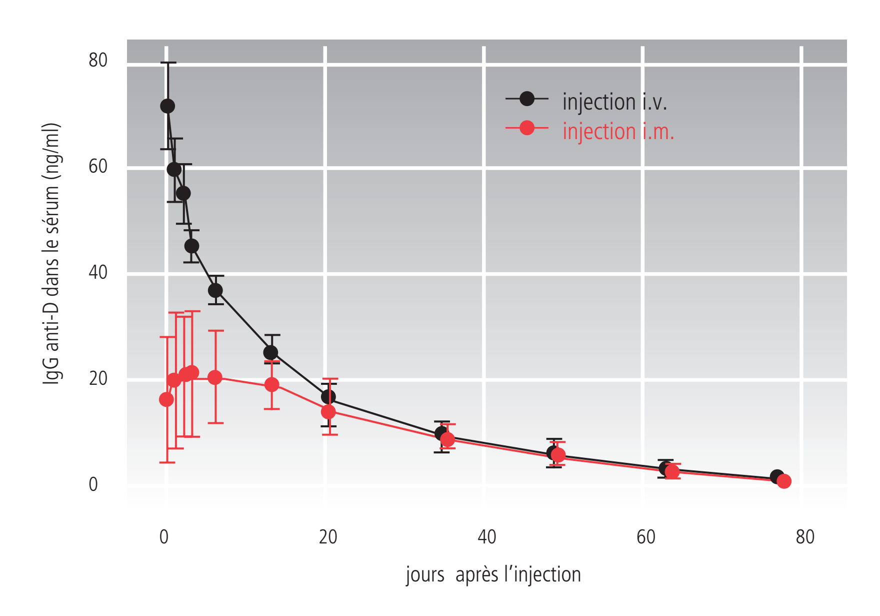
Etudes cliniques de l'efficacité anténatale et postnatale de Rhophylac® 300

L'efficacité et l'innocuité de Rhophylac® dans la prophylaxie rhésus-anténatale et postnatale ont été étudiées chez 447 femmes au total. Dans les deux études, Rhophylac® 300 a été administré par voie intraveineuse ou intramusculaire aux femmes Rhésus(D) négatif au cours de la 28ème semaine de grossesse. Une dose supplémentaire de Rhophylac® 300 a été administrée dans les 72 heures aux mères qui avaient accouché d'un enfant Rhésus(D) positif. En outre, chez 14 femmes, les concentrations sériques d'anti-D ont été déterminées quantitativement après l'administration anténatale.

Résultats

a) Concentration sérique d'anti-D après administration anténatale de Rhophylac® 300

*Fig. 5: Concentration sérique moyenne d'IgG anti-D après injection i.v. ou i.m ***



Au cours de la 28ème semaine de grossesse, les femmes Rh(D) négatif ont reçu une dose de Rhophylac® 300 par voie intraveineuse (n=6) ou intramusculaire (n=8). Les prises de sang ont été effectuées jusque dans les 11 semaines qui ont suivi et les concentrations sériques d'anti-D déterminées quantitativement par cytométrie de flux.
Un jour après l'injection intraveineuse, les concentrations sériques d'IgG anti-D étaient à peu près 5 fois plus élevées et beaucoup moins dispersées qu'après l'injection intramusculaire (71 ± 8 ng/ml, contre 15 ± 11 ng/ml). Après l'injection intramusculaire, les concentrations sériques d'IgG anti-D ont atteint leur pic (22 ± 12 ng/ml) au bout de deux à sept jours. Dans les deux modes d'administration, les concentrations sériques moyennes d'IgG anti-D se sont révélées comparables après deux à trois semaines. Chez toutes les femmes, les IgG anti-D sont restées décelables dans le sérum jusqu'à neuf semaines après l'administration et chez toutes sauf une jusqu'à onze semaines.

Les résultats obtenus avec Rhophylac® concordent en grande partie avec ceux décrits dans la littérature.

** J. Bichler, G. Schöndorfer, G. Pabst et al.: Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant women. Br. U. Obstet Gynecol 2003; 110:30-45

b) Prophylaxie de l'immunisation Rhésus(D)

Huit femmes de l'étude pharmacocinétique allemande mentionnée ci-dessus ont mis au monde un enfant Rhésus(D) positif et ont encore reçu une dose de Rhophylac® après l'accouchement. Les tests de dépistage d'anticorps effectués six à huit mois plus tard se sont révélés négatifs chez toutes les mères, prouvant ainsi que l'immunisation Rhésus(D) n'avait pas eu lieu.
Dans une autre étude menée dans 22 centres en Grande-Bretagne et aux Etats-Unis, Rhophylac® 300 a été administré à titre de traitement prophylactique anti-D à 432 femmes enceintes. Après randomisation, la moitié de ces femmes ont reçu Rhophylac® 300 par voie intraveineuse, l'autre moitié par voie intramusculaire. Rhophylac® 300 a également été administré en cas de risque d'hémorragie fœto-maternelle entre le moment de la prophylaxie rhésus anténatale de routine effectuée à la 28ème semaine de grossesse et le moment de l'accouchement, ou en cas d'hémorragie fœto-maternelle massive durant le post-partum.
Sur les 432 femmes enceintes ayant reçu Rhophylac® 300 à la 28ème semaine de grossesse, 153 ont accouché d'un enfant Rhésus(D) négatif, 270 d'un enfant Rhésus(D) positif et neuf sont sorties de l'étude pour des raisons diverses. Sur les 261 femmes ayant mis au monde un enfant Rhésus(D) positif et répondu à tous les critères d'analyse, 248* (94,7 %) se sont présentées six mois plus tard au contrôle de l'immunisation Rhésus(D). Le test à la papaïne s'est révélé négatif chez 225 femmes et faiblement positif chez 23 en ce qui concerne les anticorps anti-D. Chez seulement six de ces femmes, le test de Coombs indirect s'est révélé faiblement positif. Ces 23 femmes ont été à nouveau testées trois mois plus tard. Les deux tests ont été négatifs chez 22 d'entre elles, alors que chez la vingt-troisième le test à la papaïne était encore faiblement positif malgré un test de Coombs indirect négatif. Le sérum de cette femme a été soumis à un nouvel examen 2 mois et demi plus tard et les deux tests se sont alors révélés négatifs. Ces résultats montrent qu'aucune des femmes n'a été immunisée contre l'antigène Rhésus(D). Selon toute vraisemblance, les résultats faiblement positifs au gel-test hautement sensible sont attribuables aux immunoglobulines anti-D encore présentes dans la circulation après l'administration post-partum de Rhophylac® 300.

*y compris sept femmes qui n'avaient pas été traitées après l'accouchement du fait que la dernière injection anténatale de Rhophylac® 300 remontait à moins de 21 jours avant l'accouchement. L'administration post-partum d'anti-D n'avait donc pas été jugée nécessaire dans ces cas-là.

Bibliographie

A Stucki M, Moudry R, Kempf C et al. Characterisation of a chromatographically produced anti-D immunoglobulin product. Journal of Chromatography B, 1997; 700:241-248.

B Horowitz B, Bonomo R, Prince AM et al. Solvent/detergent treated plasma: A virus inactivated substitute for fresh frozen plasma, Blood; 1992; 79:826-831.

C Horowitz B, Prince AM, Horowitz MS et al. Viral safety of solvent detergent treated blood products. Virological Safety Aspects of Plasma-Derivatives.
Brown F (ed); Development of Biologicals Standardisation 1993; 81:147-161.

D Stucki M, Omar A, Schlegel A et al. Viral Safety of a new Anti-D immunoglobulin Product. Poster presentation, Interlaken's Fourth International; Symposium on IVIG; 1996.

E Stucki M, Kempf C. Virensicherheit von Rhophylac SRK. HAEMO, 1997; 7-10.

F Stucki M, Schnorf J, Hustinx H et al. Anti-D Immunoglobulin in Rh(D) negative volunteers: clearance of Rh(D) positive red cells and kinetics of serum anti-D levels. Transfus Clin Biol 1998; 5: 180-188.

G Bichler J, Schöndorfer G, Pabst G et al. Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant RhD-negative women. Br. J. Obstet Gynaecol 2003; 110:39-45.

H Efficacy, safety and tolerability of Rhophylac® 300 for ante- and postnatal prophylaxis in Rh(D)-negative women. Data on file.

I Dose-finding study to evaluate the efficacy and safety of MonoRho in Rh(D)-negative healthy male volunteers. Data on file.

K Phase-I study to assess the clearance of Rh(D)-positive red blood cells after intravenous administration of Rhophylac® manufactured in the Small-Scale Production Facility and in the New Production Facility in Rh(D)-negative healthy male volunteers. Data on File.

Immunoglobulines humaines anti-D

Composition: Une seringue préremplie contient 300 µg d'anticorps anti-D dans 2 ml de solution. **Indications:** Prophylaxie de l'allo-immunisation anti-D (Rh). **Posologie/Mode d'emploi:** i.v. ou i.m. prophylaxie anténatale: une dose de 300 µg administrée entre la 28ème et la 30ème semaine de grossesse. Complication au cours de la grossesse: 300 µg au plus tard dans les 72 heures suivant la complication, répéter toutes les 12 semaines. Prophylaxie postpartum: 300 µg au plus tard dans les 72 heures suivant l'accouchement. Transfusions: 20 µg/2 ml de sang transfusé ou 20 µg/1 ml de concentré érythrocytaire. Une dose de 3000 µg est suffisante, même si plus de 300 ml de sang Rhésus (D) positif ont été transfusés.



ZLB Behring (Schweiz) AG
Wankdorfstrasse 10
3000 Bern 22
Telefon: +41 31 344 2268
Fax: +41 31 344 2600

ZLB Behring

Biotherapies for Life

www.zlbbehring.ch

Rhophylac 05.06. franz. 1000 IR